

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Takao IMAEDA et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: METHOD FOR PRODUCING ANTIMICROBIAL PROTEIN AND FUSION PROTEIN

REQUEST FOR PRIORITYASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

1C821 U.S. PTO
03/0866169
05/25/01



SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

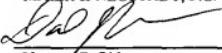
In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY	APPLICATION NUMBER	MONTH/DAY/YEAR
JAPAN	2000-161090	MAY 26, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- is submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - are submitted herewith
 - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

 Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

 Daniel J. Pereira, Ph.D.
Registration No. 45,518
**22850**Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

10021 U.S. PRO
03/03/01
03/25/01


別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2000年 5月 26日

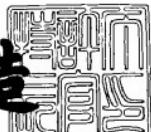
出願番号
Application Number: 特願 2000-161090

出願人
Applicant(s): 株式会社豊田中央研究所

2001年 4月 13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特 2001-3031365

【書類名】 特許願

【整理番号】 POK-00-001

【提出日】 平成12年 5月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
A61K 38/00
C12P 21/00

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1株式会社豊田中央研究所内

【氏名】 今枝 孝夫

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1株式会社豊田中央研究所内

【氏名】 山田 幸生

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1株式会社豊田中央研究所内

【氏名】 平井 正名

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1株式会社豊田中央研究所内

【氏名】 嶋村 隆

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1株式会社豊田中央研究所内

【氏名】 幸田 勝典

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1株式

会社豊田中央研究所内

【氏名】 村本 伸彦

【特許出願人】

【識別番号】 000003609

【氏名又は名称】 株式会社豊田中央研究所

【代理人】

【識別番号】 100097733

【弁理士】

【氏名又は名称】 北川 治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 049766

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716110

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗菌蛋白質の製造方法、蛋白質融合体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aを、等電点がpH7未満でありシャベロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体として原核細胞内で発現させ、これを採取した後、前記パートナー蛋白質Bの機能の利用を含む活性化工程によって前記抗菌蛋白質Aを活性型に変換することを特徴とする抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項2】 前記蛋白質融合体の発現を、前記蛋白質融合体をコードするDNAを発現可能に導入した原核細胞の培養によって行うことを特徴とする請求項1に記載の抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項3】 前記抗菌蛋白質Aがそれぞれ植物由来のチオニン、PRプロテイン、キチンバインディングプロテイン、リビッドトランスファーブロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシンであることを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項4】 前記パートナー蛋白質Bが、以下の1)又は2)のいずれかであることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載の抗菌蛋白質の製造方法。

1) プロテインジスルフィドイソメラーゼ又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質。

2) チオレドキシン又はシャベロニン。

【請求項5】 前記パートナー蛋白質Bが、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2とからなることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載の抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項6】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、等電点がpH7未満でありシャベロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの融合体であり、前記抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質

Bとが酵素により切断可能なオリゴペプチド部分を介して一連のポリペプチド鎖として構成されていることを特徴とする蛋白質融合体。

【請求項7】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2との融合体であることを特徴とする蛋白質融合体。

【請求項8】 前記酸性パートナー蛋白質B1がフミコラ・インソレンス (*Fumicola insolens*) 由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼのカルボキシ末端領域であり、前記シャベロンパートナー蛋白質B2がペプチジルプロリルーシストランス-イソメラーゼであることを特徴とする請求項7に記載の蛋白質融合体。

【請求項9】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと共に蛋白質融合体を形成するために用いられる蛋白質であって、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2とからなることを特徴とするパートナー蛋白質。

【請求項10】 請求項6～請求項8のいずれかに記載の蛋白質融合体をコードすることを特徴とするDNA。

【請求項11】 請求項10に記載のDNAを発現可能に導入した原核細胞であることを特徴とする宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性抗菌蛋白質の大量発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子組換え技術の応用により、種々の機能を持つ蛋白質が細菌、真菌、哺乳動物等の多様な発現系で発現されるようになって来ている。蛋白質の効率的大量

生産と言うことを考慮した時、特に大腸菌等の原核細胞を宿主とする発現系が有利である。一方、多くの産業分野において注目されている抗菌蛋白質の発現については、抗菌蛋白質の宿主細胞に対する毒性、比較的低分子量である抗菌蛋白質の宿主細胞内での分解等の特有の問題がある。そのため、例えば大腸菌での抗菌蛋白質生産において、次のような技術が提案されている。

【0003】

まず、抗菌蛋白質と酸性蛋白質との融合化ユニットをマルチマー化することによって、抗菌蛋白質の毒性をマスキングすると共にその細胞内での分解を抑制する方法が提案されている (Jae H. Lee, Il Minn, Chan B, et al(1998) *Protein Expression and Purification* 12 :53-60)。又、抗菌蛋白質生産を不溶性画分に発現されるプロキモシン (prochymosin) と融合化させることにより同上の効果を狙ったものもある (Chris Haught, Gregory D, Rajesh Subramanian, et al (1998) *Biotechnology and Bioengineering* 57, 1 :55-61)。同様の狙いから、抗菌蛋白質をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ3 (GST) と融合化させる方法 (Kirill A Martemyanov, Alexander S spirin, Anatoly T Gudkov (1996) *Biotechnology Letters* 18, 12 :1357-1362) や、抗菌蛋白質をセルロースバイディングドメイン (CBD) と融合化させる方法 (Kevin L Piers, Melissa H Brown, et al (1993) *Gene* 134, 1 :7-13)、抗菌蛋白質をプロテインAと融合化させる方法 (L. Zhang, T. Falla, M. Wu, et al(1998) *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 247 :674-680) 等が提案されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、抗菌蛋白質のうち重要な幾つかのものは、アミノ酸配列上にシステインが存在し、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質である。その代表的な例示として、植物由来のチオニン、PRプロテイン、キチンバインディングプロテイン、リビッドトランスファーブロテイン、リボゾーム不活性化プロテインや、植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシン等が挙げられる。

【0005】

これらのタイプの塩基性抗菌蛋白質については、前記の宿主細胞に対する毒性や、宿主細胞内での分解と言う問題に加え、更に、抗菌蛋白質を正しい一定様式の分子内ジスルフィド結合を伴う活性型で取得することが難しいと言う問題がある。一般的に、真核細胞は小胞体等の細胞内小器管で蛋白質をリフォールディング（分子内ジスルフィド結合の誤った様式を正しい一定の様式に掛け変える）する機能を有するが、原核細胞にはかかる機能がない。

【0006】

例えば、前記した各従来技術は、いずれも上記のようなタイプの塩基性抗菌蛋白質を対象としたものでなく、これらのタイプの塩基性抗菌蛋白質を活性型で取得するための方法を開示もしくは示唆しない。不活性型で取得された塩基性抗菌蛋白質に対して、シャベロン機能を有する蛋白質を *in vitro* で別途投与して活性型に変換させる手法も知られているが、高コストな方法であるため、實際にはほとんど利用されていない。

【0007】

一方、抗菌蛋白質以外の機能性蛋白質の分野で、かつ原核生物を宿主とする発現系においては、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする蛋白質を、リフォールディング機能を有する一定の蛋白質との融合体として発現させる手法が2、3提案されている。例えば特開平7-250685号公報では、一定の機能性蛋白質をチオレドキシンとの融合体として発現させる手法が提案され、特開平11-75879号公報では、機能性蛋白質をプロテインジスルフィドイソメラーゼとの融合体として発現させる手法が提案されている。しかし、これらの手法を抗菌蛋白質の発現系に応用して、仮に活性型の抗菌蛋白質を発現させることができたとしても、抗菌蛋白質が宿主細胞に対して毒性を発揮するため、有效量の抗菌蛋白質を取得できない。

【0008】

以上の点から、原核生物を宿主とする発現系を用いて、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性抗菌蛋白質を高効率に取得するためには、当該塩基性抗菌蛋白質が宿主細胞内においては不活性で細胞内分解も受けない状態で発現され、これを宿主細胞より採取した後には容易かつ低コスト

な操作により活性化できることが課題となる。本願発明は、この課題の解決を可能とする抗菌蛋白質の製造方法等を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

(第1発明の構成)

上記課題を解決するための本願第1発明（請求項1に記載の発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aを、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体として原核細胞内で発現させ、これを採取した後、前記パートナー蛋白質Bの機能の利用を含む活性化工程によって前記抗菌蛋白質Aを活性型に変換する、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0010】

(第2発明の構成)

上記課題を解決するための本願第2発明（請求項2に記載の発明）の構成は、前記第1発明に係る蛋白質融合体の発現を、前記蛋白質融合体をコードするDNAを発現可能に導入した原核細胞の培養によって行う、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0011】

(第3発明の構成)

上記課題を解決するための本願第3発明（請求項3に記載の発明）の構成は、前記第1発明又は第2発明に係る抗菌蛋白質Aが、それぞれ植物由来のチオニン、PRプロテイン、キチンバインディングプロテイン、リビッドトランスファー プロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシンである、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0012】

(第4発明の構成)

上記課題を解決するための本願第4発明（請求項4に記載の発明）の構成は、前記第1発明～第3発明のいずれかに係るパートナー蛋白質Bが以下の1)又は2)のいずれかである、蛋白質融合体である。

- 1) プロテインジスルフィドイソメラーゼ（以下、「PDI」と言う）又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質。
- 2) チオレドキシン（以下、「Tx」と言う）又はシャベロニン。

【0013】

(第5発明の構成)

上記課題を解決するための本願第5発明（請求項5に記載の発明）の構成は、前記第1発明～第3発明のいずれかに係るパートナー蛋白質Bが、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2とからなる、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0014】

(第6発明の構成)

上記課題を解決するための本願第6発明（請求項6に記載の発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、等電点がpH7未満でありシャベロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの融合体であり、前記抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが酵素により切断可能なオリゴペプチド部分を介して一連のポリペプチド鎖として構成されている、蛋白質融合体である。

【0015】

(第7発明の構成)

上記課題を解決するための本願第7発明（請求項7に記載の発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2との融合体である、蛋白質融合体である。

【0016】

(第8発明の構成)

上記課題を解決するための本願第8発明（請求項8に記載の発明）の構成は、

前記第7発明に係る酸性パートナー蛋白質B1がフミコラ・インソレンス（*Fumicola insolens*）由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼのカルボキシ末端領域であり、前記シャベロンパートナー蛋白質B2がペプチジルプロリルシス-トランス-イソメラーゼである、蛋白質融合体である。

【0017】

(第9発明の構成)

上記課題を解決するための本願第9発明（請求項9に記載の発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと共に蛋白質融合体を形成するために用いられる蛋白質であって、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2とからなる、パートナー蛋白質である。

【0018】

(第10発明の構成)

上記課題を解決するための本願第10発明（請求項10に記載の発明）の構成は、前記第6発明～第8のいずれかに係る蛋白質融合体をコードする、DNAである。

【0019】

(第11発明の構成)

上記課題を解決するための本願第11発明（請求項11に記載の発明）の構成は、前記第10発明に係るDNAを発現可能に導入した原核細胞である、宿主細胞である。

【0020】

【発明の作用・効果】

(第1発明の作用・効果)

第1発明の抗菌蛋白質の製造方法によれば、塩基性の抗菌蛋白質Aは等電点がpH7未満であるパートナー蛋白質Bとの比較的高分子量の蛋白質融合体として発現されるので、宿主細胞内で分解されない。又、抗菌蛋白質Aは、原核細胞宿主内で、通常は誤った分子内ジスルフィド結合を伴う不活性型として発現される

が、例え活性型として発現された場合でも、パートナー蛋白質Bとの融合によって毒性がマスキングされている。以上の点から、細胞分裂の速い原核細胞内において、抗菌蛋白質Aを大量に発現させることができる。

【0021】

次に、蛋白質融合体を宿主細胞より採取した後、活性化工程によって抗菌蛋白質Aを活性型に変換するが、その際にシャベロン機能を有するパートナー蛋白質Bの機能を利用して抗菌蛋白質Aのリフォールディングを行うので、低コストで活性化できる。この活性化工程において、通常は抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとを分離する操作も行う。しかし、その分離操作は蛋白質融合体の融合状態に応じて選択される簡単な操作であり、抗菌蛋白質Aを容易に活性化できる。

【0022】

(第2発明の作用・効果)

第2発明によって、第1発明に係る抗菌蛋白質の製造方法の代表的な実施形態例が提供される。

【0023】

(第3発明の作用・効果)

第3発明によって、第1発明又は第2発明に係る、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aの代表的な実施形態例が提供される。

【0024】

(第4発明の作用・効果)

第4発明によって、等電点がpH7未満でありシャベロン機能を有するパートナー蛋白質Bの代表的な例が提供される。その内でも、PDI又は植物由来のチオニン下流にコードされる酸性蛋白質が、抗菌蛋白質Aのジスルフィド結合に対するリフォールディング機能において特に優れる。

【0025】

(第5発明の作用・効果)

蛋白質融合体におけるパートナー蛋白質Bは、第5発明のように酸性パートナー蛋白質B1とシャベロンパートナー蛋白質B2とからなっていても良い。この

場合、蛋白質融合体は、抗菌蛋白質Aと、酸性パートナー蛋白質B1と、シャベロンパートナー蛋白質B2との3種類の蛋白質が融合されている。

【0026】

(第6発明の作用・効果)

抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体は両者の電気的親和力により融合していくても良いが、第6発明のように両者が一連のポリペプチド鎖として構成されていると、宿主細胞内で発現された両者が確実に蛋白質融合体を形成する。しかも両者の蛋白質間には酵素により切断可能なオリゴペプチド部分が介在するので、活性化工程においては、この部分の酵素的切断により両者の蛋白質を容易に分離できる。

【0027】

(第7発明の作用・効果)

第7発明により、第6発明とは異なるタイプの蛋白質融合体例が提供される。この蛋白質融合体においては、酸性パートナー蛋白質B1とシャベロンパートナー蛋白質B2とがパートナー蛋白質Bの前記役割を分担する。

【0028】

(第8発明の作用・効果)

第8発明により、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1の代表的な例と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2の代表的な例とを含む蛋白質融合体が提供される。

【0029】

(第9発明の作用・効果)

第9発明によって、第7発明又は第8発明の蛋白質融合体における抗菌蛋白質Aのパートナーとなるべきパートナー蛋白質が提供される。

【0030】

(第10発明の作用・効果)

第10発明により、第6発明～第8発明に係る蛋白質融合体の遺伝子工学的具体的生産手段が提供される。

【0031】

(第11発明の作用・効果)

第11発明により、第10発明のDNAを利用した蛋白質融合体の具体的な発現の場が提供される。

【0032】

【発明の実施の形態】

次に、第1発明～第11発明の実施の形態について説明する。以下において單に「本発明」と言うときは、第1発明～第11発明を一括して指している。

【0033】

【蛋白質融合体】

本発明に係る蛋白質融合体は、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの融合体である。ここに「融合」とは、二種以上の異種蛋白質の一部あるいは全部が何らかの力によって一体化している状態を言う。「融合」の例として、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが化学的に結合している融合形態を例示できる。この融合形態は、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが切断可能なオリゴペプチド部分を介して一連のポリペプチド鎖として構成されている場合を含む。抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの一部あるいは全部が疎水性親和力や電気的性質等によって会合している融合形態等も例示できる。いずれの場合においても、抗菌蛋白質Aがアミノ酸配列上にシステインが存在する塩基性蛋白質であり、パートナー蛋白質Bが等電点がpH7未満であるため、両者が確実に融合する。

【0034】

【抗菌蛋白質A】

本発明に係る抗菌蛋白質Aは、アミノ酸配列上にシステインが存在し、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を抗菌活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質である。本発明に係る蛋白質融合体を構成している抗菌蛋白質Aの存在状態としては、元々誤った様式のジスルフィド結合の形成を伴って、不活性型として発現しているケースが例示される。正しい様式の分子内ジスルフィド結合の形成により活性型の立体構造を取っているが、パートナー蛋白質Bとの融合により電荷が中和され又は不溶化しているために毒性がマスキングされているケースも例示される。パートナー蛋白質Bとの融合によって抗菌活性型の条件であるジスルフ

イド結合を形成できないために、無毒化されているケースも例示される。

【0035】

抗菌蛋白質Aの種類は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を抗菌活性型の条件とし、かつ塩基性の抗菌蛋白質である限りにおいて限定されない。しかし、それぞれ植物由来のチオニン、P R プロテイン、キチンバインディングプロテイン、リビッドトランスファーブロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシン等を特に好ましく例示することができる。上記植物由来のチオニンとしては、例えば大麦由来のもの、更に具体的には配列番号1に示すアミノ酸配列中の10位～54位のアミノ酸からなるものが好ましく例示される。

【0036】

【パートナー蛋白質B】

本発明に係るパートナー蛋白質Bは、等電点がpH7未満でありシャベロン機能を有する蛋白質である。ここに「シャベロン機能」とは、対象とする蛋白質の立体構造を正しく変更させ得る機能を言い、本発明においては特に、蛋白質の分子内ジスルフィド結合の形成部位を活性型として正しい状態に変更させるリフォールディング機能が好ましい。上記等電点としても、pH6以下のもの、とりわけpH5.5以下のものが好ましい。又、パートナー蛋白質Bは、単一のパートナー蛋白質からなる場合と、酸性パートナー蛋白質B1及びシャベロンパートナー蛋白質B2からなる場合とがある。

【0037】

パートナー蛋白質Bの種類は上記の規定に合致する限りにおいて限定されない。しかし、単一のパートナー蛋白質Bとしては、PDI(等電点pH4.68)又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質(等電点pH3.61)を特に好ましく例示することができる。

【0038】

上記PDIとしては、例えば前記フミコラ・インソレンス由来のもの、更に具体的には配列番号2に示すアミノ酸配列中の59位～543位のアミノ酸からな

るものが好ましく例示される。上記酸性蛋白質としては、大麦由来のチオニンに對して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質、更に具体的には配列番号1に示すアミノ酸配列中の61位～124位のアミノ酸からなるものが好ましく例示される。

【0039】

单一のパートナー蛋白質Bとしては、その他にもTx(等電点pH5.14)を好ましく例示できる。更に、GroEL(等電点pH5.08), GroES(等電点pH4.51), HSP90(等電点pH4.67)等のシャベロニンも、好ましく例示できる。

【0040】

上記酸性パートナー蛋白質B1としては、フミコラ・インソレンス由来のPDⅠのカルボキシル末端である514位のグルタミン酸～543位のロイシンの領域(等電点pH3.95)を例示できるが、その他の等電点が酸性域に存する任意の蛋白質でも構わない。上記シャベロンパートナー蛋白質B2としてはPPIを好ましく例示できる。シャベロンパートナー蛋白質B2の等電点は限定されないが、その等電点が酸性域でない場合には、宿主細胞における発現の際に抗菌蛋白質Aと融合するための任意の手段(例えば、酵素的に切断可能なオリゴペプチド部分を介して抗菌蛋白質Aと一連のポリペプチド鎖として構成されている)を施すことが好ましい。

【0041】

〔蛋白質融合体をコードするDNA〕

本発明の抗菌蛋白質の製造方法においては、前記したいずれかの蛋白質融合体をコードするDNAを原核細胞である宿主細胞に発現可能に導入して、蛋白質融合体を効率良く大量生産することができる。これらのDNAは、上記抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとをコーディングしている限りにおいて、その具体的な塩基配列を限定しない。

【0042】

上記コーディングの態様として、单一の構造遺伝子として抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質B(又は、酸性パートナー蛋白質B1及びシャベロンパートナー蛋白質B2)を組み込んだ複合遺伝子を用いる。この複合遺伝子は、上記の蛋白質融合体をコードするDNAと同一の構造を有する。

白質B 2) とを連続してコードしている場合があり得る。単一の構造遺伝子として抗菌蛋白質Aと、任意の手段によって切断可能な中間オリゴペプチド部分と、パートナー蛋白質B (又は、酸性パートナー蛋白質B 1 及びシヤベロンパートナー蛋白質B 2) とを連続してコードしている場合もあり得る。抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとを、あるいは抗菌蛋白質A、酸性パートナー蛋白質B 1、シヤベロンパートナー蛋白質B 2 の内の二者以上を、適宜な介在配列を介することにより、異なる構造遺伝子としてコードしている場合もあり得る。かかるDNAとしては、例えば配列番号1又は配列番号2に示す塩基配列からなるものを、それぞれ特に好ましく例示できる。

【0043】

〔DNAを発現可能に導入した宿主細胞〕

上記DNAは、一般論としては、任意の適宜な宿主細胞に発現可能に導入することができ、宿主細胞の種類は限定されない。例えば、大腸菌等のような原核細胞、酵母等のような真核細胞のほか、任意の種類の植物細胞や非ヒト動物細胞を利用できる。しかし本発明においては、原核細胞を宿主とする。

【0044】

DNAを宿主細胞に発現可能に導入するためには、適当な任意の発現ベクターを利用できる。特に好ましく利用可能な発現ベクターとして、例えば大腸菌用にはStratagene社製の「pET Expression system」等のプラスミドを例示できる。発現ベクターへのDNAの挿入や、宿主細胞への発現ベクターの導入は、公知の任意の方法により行うことができる。

【0045】

〔抗菌蛋白質の製造方法〕

抗菌蛋白質の製造方法は、蛋白質融合体の製造過程を含む。この過程は、例えば上記所定のDNAを発現可能に導入した宿主細胞を培養するものである。宿主細胞の培養方法や培養条件は限定されない。

【0046】

製造した蛋白質融合体を宿主細胞から採取する際の採取方法や精製方法等について、必要に応じて任意の手法を採用すれば良い。本発明に係る蛋白質融合体

は、その保存方法や保存条件によっては、抗菌蛋白質Aよりも保存性が優れる場合がある。従って抗菌蛋白質の製造方法を完了に到るまで実施せず、蛋白質融合体の保存、流通等を目的として蛋白質融合体の製造及び採取までの過程のみを実施する場合があり得る。蛋白質融合体の「採取」とは、クルードな状態での採取もあり得るし、精製状態での採取もあり得る。

【0047】

抗菌蛋白質の製造方法は、少なくともパートナー蛋白質Bの機能を利用して抗菌蛋白質Aを抗菌活性型に変換する過程を含むが、通常は蛋白質融合体における抗菌蛋白質Aをパートナー蛋白質Bから分離する過程も含む。上記の両過程は同時に進行する場合もあるし、順次経時的に進行する場合もある。

【0048】

抗菌蛋白質Aをパートナー蛋白質Bから分離する過程は、両者が一連のポリペプチド鎖によって構成されている場合には、その境界部（又は境界部に介在させた切断用のオリゴペプチド部分）におけるペプチド結合を切断する操作を伴う。両者が別個のポリペプチド鎖によって構成され電気的性質等により会合している場合には、これらを分離させる適宜な処理を伴う。

【0049】

抗菌蛋白質Aを抗菌活性型に変換する過程は、パートナー蛋白質Bの機能によって自動的に進行し完了することを期待できる。但し、この過程の促進のために、その他の任意のジスルフィド結合リフォールディング操作を並行して行っても良い。

【0050】

【発明の好ましい実施態様】

本発明は、以下の実施態様において好ましく実施することができる。なお、本項において、「上記」と言うときは、該当する内容の先行する番号の実施態様の全てを、いずれも逐一に選択可能に指している。

(1) 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aを、等電点がpH7未満でありシャベロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体として原核細胞内で発現させ、これを採取した後、前

記パートナー蛋白質Bの機能の利用を含む活性化工程によって前記抗菌蛋白質Aを活性型に変換する抗菌蛋白質の製造方法。

(2) 上記蛋白質融合体において、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが化学的に結合している。

(3) 上記蛋白質融合体において、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが、酵素によって切断可能なオリゴペプチド部分を介して、一連のポリペプチド鎖として構成されている。

(4) 上記蛋白質融合体において、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの一部あるいは全部が疎水性親和力又は電気的性質によって会合している。

(5) 上記抗菌蛋白質Aが、それぞれ植物由来のチオニン、P Rプロテイン、キチンバインディングプロテイン、リビッドトランスファーブロテイン、リボソーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシンである。

(6) 上記植物由来のチオニンが大麦由来のものである。

(7) 上記植物由来のチオニンが、配列番号1に示すアミノ酸配列中の10位～54位のアミノ酸からなるものである。

(8) 上記パートナー蛋白質Bの等電点がpH6以下、とりわけpH5.5以下である。

(9) 上記パートナー蛋白質Bのシャベロン機能が、蛋白質の分子内ジスルフィド結合の形成部位を活性型としての正しい状態に変更させるリフォールディング機能である。

(10) 上記パートナー蛋白質BがPDI又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質である。

(11) 上記PDIが、フミコラ・インソレンス由来のPDI、更に具体的には配列番号2に示すアミノ酸配列中の59位～543位のアミノ酸からなるPDIである。

(12) 上記酸性蛋白質が大麦由来の酸性蛋白質、更に具体的には配列番号1に示すアミノ酸配列中の61位～124位のアミノ酸からなる酸性蛋白質である。

(13) 上記パートナー蛋白質BがTx又はシャベロニンである。

(14) 上記パートナー蛋白質Bが、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャベロン機能を有するシャベロンパートナー蛋白質B2とからなる。

(15) 上記酸性パートナー蛋白質B1がフミコラ・インソレンス由来のPDIのカルボキシル末端の所定領域である。

(16) 上記シャベロンパートナー蛋白質B2がPPIである。

(17) 上記抗菌蛋白質Aと共に蛋白質融合体を形成するために用いられる蛋白質であって、上記酸性パートナー蛋白質B1とシャベロンパートナー蛋白質B2とからなるパートナー蛋白質。

(18) 上記いずれかの蛋白質融合体をコードするDNA。

(19) 上記DNAが、単一の構造遺伝子として抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質B(又は、酸性パートナー蛋白質B1及びシャベロンパートナー蛋白質B2)とを連続してコードしている。

(20) 上記DNAが、単一の構造遺伝子として、抗菌蛋白質Aと、任意の手段によって切断可能な中間オリゴペプチド部分と、パートナー蛋白質B(又は、酸性パートナー蛋白質B1及びシャベロンパートナー蛋白質B2)とを連続してコードしている。

(21) 上記DNAが、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとを、あるいは抗菌蛋白質A、酸性パートナー蛋白質B1、シャベロンパートナー蛋白質B2の内、抗菌蛋白質Aを含む二者以上を、任意の介在配列を介することにより、異なる構造遺伝子としてコードしている。

(22) 上記DNAが、配列番号1又は配列番号2に示す塩基配列からなる。

(23) 上記DNAが、配列番号1又は配列番号2に示す塩基配列からなるDNAに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、かつ、抗菌蛋白質A、パートナー蛋白質B、酸性パートナー蛋白質B1、シャベロンパートナー蛋白質B2の内、抗菌蛋白質Aを含む二者以上をコードしている。

(24) 上記DNAを発現可能に導入した宿主細胞。

(25) 上記宿主細胞が原核細胞である。

(26) 上記宿主細胞を培養して、上記いずれかの蛋白質融合体を採取する蛋白

質融合体の製造過程。

(27) 上記蛋白質融合体を保存又は流通に供する。

(28) 上記いずれかの蛋白質融合体における抗菌蛋白質Aをパートナー蛋白質Bから分離する過程と、前記抗菌蛋白質Aを前記パートナー蛋白質Bの機能によって抗菌活性型に変換する過程とを含む抗菌蛋白質の製造方法。

(29) 上記抗菌蛋白質Aをパートナー蛋白質Bから分離する過程が、両者の境界部（又は境界部に介在させた切断用のオリゴペプチド部分）におけるペプチド結合を切断する操作を伴う。

(30) 上記抗菌蛋白質Aを抗菌活性型に変換する過程が、その過程の促進のための通常のジスルフィド結合リフォールディング操作を伴う。

【0051】

【実施例】

(実施例1：チオニン-酸性蛋白質融合体遺伝子の構築)

大麦由来のチオニンと、大麦由来のチオニンに対し塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質との融合体をコードする遺伝子を作成し、Novagen社製のプラスミド pET-19bにおける制限酵素NdeI-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0052】

大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号1における第28位～第162位の塩基配列を有し、上記酸性蛋白質の遺伝子は配列番号1における第181位～第372位の塩基配列を有する。配列番号1において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素 NdeI による切断領域であり、第378位～第383位のGGATCCの塩基配列は制限酵素 BamH1による切断領域である。併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位及び第56位～第59位の Thr-Glu-Gly-Arg のアミノ酸配列は、プロテアーゼである Factor Xa の認識部位である。

【0053】

(実施例2：チオニン-PDI融合体遺伝子の構築)

大麦由来のチオニンと、フミコラ・インソレンス由来のPDIとの蛋白質融合体をコードする遺伝子を作成し、これを Novagen社製のプラスミド pET-19bにお

ける制限酵素NdeI-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0054】

大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号2における第25位～第159位の塩基配列を有する。上記PDIの遺伝子は配列番号2における第175位～第1629位の塩基配列を有する。配列番号2において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素NdeIによる切断領域であり、第1635位～第1640位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamH1による切断領域である。一方、併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位及び第55位～第58位のThr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列はFactor Xaの認識部位である。

【0055】

(比較例1：チオニン遺伝子の構築)

大麦由来のチオニンをコードする遺伝子をNovagen社製のプラスミドpET-19bにおける制限酵素NdeI-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0056】

大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号3における第28位～第162位の塩基配列を有する。配列番号3において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素NdeIによる切断領域であり、第168位～第173位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamH1による切断領域である。一方、併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位のThr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列はFactor Xaの認識部位である。

【0057】

(比較例2：チオニン-PDI酸性領域融合体遺伝子の構築)

フミコラ・インソレンス由来のPDIのカルボキシル末端には、酸性アミノ酸の多い酸性領域が存在する。大麦由来のチオニンと、上記酸性領域との蛋白質融合体をコードする遺伝子を作成し、これをNovagen社製のプラスミドpET-19bにおける制限酵素NdeI-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0058】

上記酸性領域は、PDIの活性部位が含んでいないため、ジスルフィド結合をリフォールディングする触媒作用を備えていないものと思われる。

【0059】

大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号4における第25位～第159位の塩基配列を有し、上記酸性領域の遺伝子は第175位～第264位の塩基配列を有する。配列番号4において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素NdeIによる切断領域であり、第270位～第275位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamH1による切断領域である。併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位及び第35位～第38位のThr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列はFactor Xaの認識部位である。

【0060】

(遺伝子の大腸菌内での発現)

実施例1、実施例2、比較例1及び比較例2で構築されたベクターを用いて、それぞれ大腸菌 BL21(DE3)pLysS に形質転換した。取得したそれぞれの形質転換株をLB培地 (bacto-tryptone 1%, bacto-yeast extract 0.5%, NaCl 1%) で37°Cにて一晩培養し、これをLB培地に1%植菌した。そして37°CでOD=0.5まで培養し、IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) を最終濃度1mMになるように添加して、誘導発現を6時間行った。

【0061】

その後、培養液を遠心分離により集菌し、湿菌体重量の10倍のSonicationバッファーを加えて懸濁した。超音波により菌体を破碎した後、15000 rpmで30分の遠心分離を行い、上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分とした。

【0062】

これらをSDS-PAGEに供した結果、比較例1に係るチオニンは発現しなかったが、他の実施例及び比較例に係る蛋白質融合体はいずれも不溶性画分に発現を認めた。

【0063】

(蛋白質融合体の回収)

上記において発現を認めた実施例1、実施例2及び比較例2に係る蛋白質融合体の不溶性画分と、抗菌活性測定時のコントロールとするベクター非導入の大腸菌 BL21(DE3)pLysS の培養に係る不溶性画分とを、0.5% TritonX-100/1mM

D T A 溶液で 2 回洗浄した後、尿素溶液（8 M 尿素、50mM Tris-HCl pH8.0、1mM DTT、1mM EDTA）を加えて可溶化した。遠心分離の後、上清を透析チューブに移し、4 M 尿素溶液に対して 4° C で 1 時間透析を行った。上記 DTT を含む尿素溶液での透析時、チオニンのジスルフィド結合が切断されていると考えられる。

【0064】

その後透析外液を 2 M 尿素溶液、プロテアーゼ切断に供するためのバッファー（50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、1mM 塩化カルシウム）に順次交換した後、後者のバッファーにて一晩透析を行った。この透析時、チオニンのジスルフィド結合がリフォールディングされていると考えられる。透析終了後、遠心分離して上清を後述の Factor Xa による切断に用いた。

【0065】

上述の操作中に、チオニンと PDI との蛋白質融合体又はチオニンと酸性蛋白質との蛋白質融合体（実施例 1 又は実施例 2）においては、透析自体によるチオニンのリフォールディング効果に加え、PDI 又は酸性蛋白質によるリフォールディング効率の向上を期待できる。

【0066】

（プロテアーゼによる蛋白質融合体の切断）

上記のように透析を行った実施例 1、実施例 2 及び比較例 2 に係る蛋白質融合体はそれぞれ、前記配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 4 に示すように、チオニンとそのパートナー蛋白質との間に、プロテアーゼである Factor Xa の認識配列を保持している。そこで、上記の各蛋白質融合体 1 mg に対して、Factor Xa 30 μg を用いて、30° C にて一晩、Factor Xa による切断に供した。

【0067】

（抗菌活性の測定）

上記の切断操作により得られた蛋白質溶液を、限外濾過膜を利用した濃縮ユニットである Microcon-3 (MWCO:3000) を用いて 30 μL に濃縮した。このような多数の濃縮サンプル液 30 μL をそれぞれ 96 穴マイクロプレートの各ウエルに注入し、更に各ウエルに対して pH 6 の 200 mM MES (2-(N-morpholino)エタン

スルホン酸) パッファー 10 μL、サツマイモ黒斑病菌 (Ceratocystis fimbria ta: IF030501) の分生胞子懸濁液 (胞子数 1 mL 当たり 10 万: 80 % ポテトデキストロースプロス) 60 μL を加え、26°C で培養した。別途、コントロールとして前記ベクター非導入の大腸菌の培養に係る不溶性画分についても同上の操作を行った。

【0068】

そして Model 13550マイクロプレートリーダーを用いて 30 分後及び 48 時間後の吸光度 (415nm) を測定した。発育阻害率を、次の式 1 により求めた。なお、式 1において、A は上記 30 分後の吸光度の測定値、B は上記 48 時間後の吸光度の測定値である。

【0069】

$$\text{発育阻害率 (\%)} = (B - A) \times 100 / B \dots \text{式 1}$$

その結果、コントロールの発育阻害率は 9.6 % であった。そして比較例 2 は発育阻害率が 11.5 % であり、実質的に抗菌活性が認められなかった。実施例 1 は発育阻害率が 99.8 %、実施例 2 は発育阻害率が 99.1 % であり、高い抗菌活性が認められた。比較例 2 と、実施例 1 及び実施例 2 との上記のような差異は、パートナー蛋白質による前記リフォールディング効率の向上効果の有無に起因することができる。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TOYOTA CENTRAL R&D LABS., INC.

<120> 抗菌蛋白質の製造方法、蛋白質融合体

<130> POK-00-001

<160> 4

<210> 1

<211> 392

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 1

gac aag cat atg att gaa ggt cgt atg aaa agc tgc tgc cgt agc acc 48

Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Met Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr

5

10

15

ctg ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt gcg cag aaa 96

Leu Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys

20

25

30

ctg tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc 144

Leu Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys

35

40

45

ccg acc ggt ttt ccg aaa atg att gaa ggt cgt acg ctg gcg ctg gtt 182
 Pro Thr Gly Phe Pro Lys Met Ile Glu Gly Arg Thr Leu Ala Leu Val

50

55

60

agc aac agc gat gaa ccg gat acc gtt aaa tat tgc aac ctg ggt tgc 240
 Ser Asn Ser Asp Glu Pro Asp Thr Val Lys Tyr Cys Asn Leu Gly Cys
 65 70 75 80

cgt gcg agc atg tgc gat tat atg gtt aac gcg gcg gcg gat gat gaa 288
 Arg Ala Ser Met Cys Asp Tyr Met Val Asn Ala Ala Asp Asp Glu
 85 90 95

gaa atg aaa ctg tat ctg gaa aac tgc ggt gat gcg tgc gtt aac ttt 336
 Glu Met Lys Leu Tyr Leu Glu Asn Cys Gly Asp Ala Cys Val Asn Phe
 100 105 110

tgc aac ggt gat gcg ggt ctg acc agc ctg acc gcg tga tag gat ccg 384
 Cys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Thr Ser Leu Thr Ala *** *** Asp Pro
 115 120 125

gct gct aa 392
 Ala Ala
 130

<210> 2

<211> 1649

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

gac aag cat atg att gaa ggt cgt aaa agc tgc tgc cgt agc acc ctg 48
 Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr Leu

5

10

15

ggc cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggc cag aaa ctg 96
 Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys Leu

20

25

30

tgc ggc ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc ccg 144
 Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys Pro

35

40

45

acc ggt ttt ccg aaa atg att gaa ggt cgt tcg gat gtt gtc cag ctg 192
 Thr Gly Phe Pro Lys Met Ile Glu Gly Arg Ser Asp Val Val Gln Leu

50

55

60

aag aag gac acc ttc gac gac ttc atc aag acg aat gac ctt gtt ctc 240
 Lys Lys Asp Thr Phe Asp Asp Phe Ile Lys Thr Asn Asp Leu Val Leu

65

70

75

80

gcc gaa ttc ttc gcg ccg tgg tgc ggt cac tgc aag gct ctc gcc ccc 288
 Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro

85

90

95

gag tac gag gag gct gcg acc aca ctg aag gag aag aac atc aag ctc 336
 Glu Tyr Glu Glu Ala Ala Thr Thr Leu Lys Glu Lys Asn Ile Lys Leu

100	105	110
gcc aag gtg gac tgc aca gag gag acg gac ctc tgc caa caa cat ggt 384		
Ala Lys Val Asp Cys Thr Glu Glu Thr Asp Leu Cys Gln Gln His Gly		

115	120	125
gtt gag ggc tac ccg act ctc aag gtc ttc cgc ggc ctt gac aac gtc 432		
Val Glu Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Val Phe Arg Gly Leu Asp Asn Val		

130	135	140
tcc ccc tac aag ggc cag cgc aag gct gct gct atc acc tcg tac atg 480		
Ser Pro Tyr Lys Gly Gln Arg Lys Ala Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Met		

145	150	155	160
atc aag cag tct ctg ccc gcc gtg tcc gag gtc acg aag gac aac ctg 528			
Ile Lys Gln Ser Leu Pro Ala Val Ser Glu Val Thr Lys Asp Asn Leu			

165	170	175
gag gag ttc aag aag gcc gac aag gcc gtc ctt gtc gcc tat gtg gat 576		
Glu Glu Phe Lys Lys Ala Asp Lys Ala Val Leu Val Ala Tyr Val Asp		

180	185	190
gct tcc gac aag gcg tcc agt gag gtt ttc acc cag gtc gcc gag aag 624		
Ala Ser Asp Lys Ala Ser Ser Glu Val Phe Thr Gln Val Ala Glu Lys		

195	200	205
ctg cgc gac aac tac ccg ttc ggc tcc agc agc gat gct gcg ctg gcc 672		
Leu Arg Asp Asn Tyr Pro Phe Gly Ser Ser Asp Ala Ala Leu Ala		

210	215	220
-----	-----	-----

gag gct gag ggc gtc aag gct ccc gct atc gtc ctt tac aag gac ttt 720

Glu Ala Glu Gly Val Lys Ala Pro Ala Ile Val Leu Tyr Lys Asp Phe

225 230 235 240

gat gag ggc aag gcg gtc ttc tcc gag aag ttc gag gtg gag gcg atc 768

Asp Glu Gly Lys Ala Val Phe Ser Glu Lys Phe Glu Val Glu Ala Ile

245 250 255

gag aag ttc gcc aag acg ggc gcc acc ccg ctc att ggc gag att ggc 816

Glu Lys Phe Ala Lys Thr Gly Ala Thr Pro Leu Ile Gly Glu Ile Gly

260 265 270

ccc gaa acc tac tcc gac tac atg tcg gcc ggc atc cct ctg gcc tac 864

Pro Glu Thr Tyr Ser Asp Tyr Met Ser Ala Gly Ile Pro Leu Ala Tyr

275 280 285

att ttc gcc gaa acg gcc gag gag cgg aag gag ctc agc gac aag ctc 912

Ile Phe Ala Glu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Glu Leu Ser Asp Lys Leu

290 295 300

aag ccg atc gcc gag gct cag cgc ggc gtc att aac ttt ggt act att 960

Lys Pro Ile Ala Glu Ala Gln Arg Gly Val Ile Asn Phe Gly Thr Ile

305 310 315 320

gac gcc aag gct ttt ggt gcc cac gcc ggc aac ctg aac ctg aag acc 1008

Asp Ala Lys Ala Phe Gly Ala His Ala Gly Asn Leu Asn Leu Lys Thr

325 330 335

gac aag ttc ccc gcc ttc gcc atc cag gag gtc gcc aag aac cag aag 1056
 Asp Lys Phe Pro Ala Phe Ala Ile Gln Glu Val Ala Lys Asn Gln Lys

340 345 350

ttc ccc ttc gat cag gag aag gag atc acc ttc gag gcg atc aag gct 1104
 Phe Pro Phe Asp Gln Glu Lys Glu Ile Thr Phe Glu Ala Ile Lys Ala

355 360 365

ttc gtc gac gac ttt gtc gcc ggt aag atc gag ccc agc atc aag tcg 1152
 Phe Val Asp Asp Phe Val Ala Gly Lys Ile Glu Pro Ser Ile Lys Ser

370 375 380

gag ccg atc cct gag aag cag gag ggc ccc gtc acc gtc gtc gtt gcc 1200
 Glu Pro Ile Pro Glu Lys Gln Glu Gly Pro Val Thr Val Val Val Ala

385 390 395 400

aag aac tac aat gag atc gtc ctg gac gac acc aag gat gtg ctg att 1248
 Lys Asn Tyr Asn Glu Ile Val Leu Asp Asp Thr Lys Asp Val Leu Ile

405 410 415

gag ttc tac gcc ccg tgg tgc ggc cac tgc aag gcc ctg gct ccc aag 1296
 Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Lys

420 425 430

tac gag gag ctc ggc gcc ctg tat gcc aag agc gag ttc aag gac cgg 1344
 Tyr Glu Glu Leu Gly Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Glu Phe Lys Asp Arg

435 440 445

gtc gtc atc gcc aag gtt gat gcc acg gcc aac gac gtt ccc gat gag 1392

Val Val Ile Ala Lys Val Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Asp Glu

450	455	460
-----	-----	-----

atc cag gga ttc ccc acc atc aag ctg tac ccg gcc ggt gcc aag ggt 1440

Ile Gln Gly Phe Pro Thr Ile Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Lys Gly

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

cag ccc gtc acc tac tct ggc tcg cgc act gtc gag gac ctc atc aag 1488

Gln Pro Val Thr Tyr Ser Gly Ser Arg Thr Val Glu Asp Leu Ile Lys

485	490	495
-----	-----	-----

ttc atc gcc gag aac ggc aag tac aag gcc gcc atc tcg gag gat gcc 1536

Phe Ile Ala Glu Asn Gly Tyr Lys Ala Ala Ile Ser Glu Asp Ala

500	505	510
-----	-----	-----

gag gag acg tcg tcc gca acc gag acg acc acc gag acg gcc acc aag 1584

Glu Glu Thr Ser Ser Ala Thr Glu Thr Thr Glu Thr Ala Thr Lys

515	520	525
-----	-----	-----

tcg gag gag gct gcc aag gag acg gcg acg gag cac gac gag ctc tga 1632

Ser Glu Glu Ala Ala Lys Glu Thr Ala Thr Glu His Asp Glu Leu ***

530	535	540	543
-----	-----	-----	-----

tag gat ccg gct gct aa 1649

*** Asp Pro Ala Ala

545	549
-----	-----

<210> 3

<211> 182

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 3

gac aag cat atg att gaa ggt cgt atg aaa agc tgc tgc cgt agc acc	48	
Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Met Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr		
5	10	15

ctg ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt ggc cag aaa	96	
Leu Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys		
20	25	30

ctg tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc	144	
Leu Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys		
35	40	45

ccg acc ggt ttt ccg aaa tga tag gat ccg gct gct aa	182	
Pro Thr Gly Phe Pro Lys *** *** Asp Pro Ala Ala		
50	55	60

<210> 4

<211> 284

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 4

gac aag cat atg att gaa ggt cgt aaa agc tgc tgc cgt agc acc ctg	48	
Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr Leu		
5	10	15
29		

ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt gcg cag aaa ctg 96

Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys Leu

20

25

30

tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc ccg 144

Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys Pro

35

40

45

acc ggt ttt ccg aaa atg att gaa ggt cgt gag acg tcg tcc gca acc 192

Thr Gly Phe Pro Lys Met Ile Glu Gly Arg Glu Thr Ser Ser Ala Thr

50

55

60

gag acg acc acc gag acg gcc acc aag tcg gag gag gct gcc aag gag 240

Glu Thr Thr Glu Thr Ala Thr Lys Ser Glu Glu Ala Ala Lys Glu

65

70

75

80

acg gcg acg gag cac gac gag ctc tga tag gat ccg gct gct aa

284

Thr Ala Thr Glu His Asp Glu Leu *** *** Asp Pro Ala Ala

85

90

94

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 適正なジスルフィド結合の形成を抗菌活性発現の条件とする塩基性抗菌蛋白質の安価で有利な大量発現系を実現する。

【解決手段】 宿主細胞内において、上記塩基性抗菌蛋白質と、等電点が7未満でシャベロン機能を有するパートナー蛋白質との抗菌不活性な蛋白質融合体を発現させ、この蛋白質融合体を採取した後、両者を分離して、パートナー蛋白質により抗菌蛋白質を活性化する。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 (000003609)

1. 変更年月日 1990年 9月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1
氏 名 株式会社豊田中央研究所